

中华蜜蜂 β -GBP 基因在抵抗蜜蜂球囊菌侵染中的作用

王芳吉^{1#}, 陈心蕊^{1#}, 高雅琴¹, 张雨薇¹, 干根超¹, 周帅¹, 郭睿^{1,2,3},
邱剑丰^{1,2,3}, 付中民^{1,2,3*}, 陈大福^{1,2,3*}

- 1 福建农林大学 蜂学与生物医药学院, 福建 福州
- 2 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福建 福州
- 3 福建农林大学 蜂疗研究所, 福建 福州

王芳吉, 陈心蕊, 高雅琴, 张雨薇, 干根超, 周帅, 郭睿, 邱剑丰, 付中民, 陈大福. 中华蜜蜂 β -GBP 基因在抵抗蜜蜂球囊菌侵染中的作用[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2393-2403.

WANG Fangji, CHEN Xinrui, GAO Yaqin, ZHANG Yuwei, GAN Genchao, ZHOU Shuai, GUO Rui, QIU Jianfeng, FU Zhongmin, CHEN Dafu. Role of the β -1,3-glucan-binding protein gene in *Apis cerana cerana* against *Ascosphaera apis* infection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2393-2403.

摘要: 【目的】解析中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白(Ac β -GBP)在响应蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)侵染时的表达谱, 探究干扰 Ac β -GBP 对蜜蜂球囊菌侵染的幼虫死亡率及白垩病发病率的影响, 为进一步的功能研究奠定基础。【方法】基于生物信息学方法分析 Ac β -GBP 的序列和结构特征; 采用实时荧光定量逆转录 PCR (real-time RT-PCR, RT-qPCR)技术调查幼虫肠道中 Ac β -GBP 在球囊菌侵染后的表达特征; 通过 RNA 干扰技术探究 Ac β -GBP 对幼虫死亡率及白垩病发病率的影响。【结果】中华蜜蜂 Ac β -GBP 的 CDS 长度为 1 440 bp, 编码蛋白的分子质量约为 54.68 kDa, 平均亲水系数为-0.22, 存在典型的跨膜结构域和信号肽。进化分析表明, 中华蜜蜂与小蜜蜂(*Apis florea*)、大蜜蜂(*Apis dorsata*)的 β -GBP 共同聚为一大支。蜜蜂球囊菌侵染后, 中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中 Ac β -GBP 的表达量在 1-3 dpi 均显著下调($P<0.05$); 干扰 Ac β -GBP 后, 其表达量在 2 dpi 和 3 dpi 极显著低于 ds-egfp 组($P<0.01$)。幼虫累计死亡率和白垩病发病率均随侵染时间增加而升高, 且整体死亡率极显著高于对照组($P<0.0001$)。【结论】Ac β -GBP 能够响应蜜蜂球囊菌的侵染, 干扰 Ac β -GBP 表达显著降低蜜蜂幼虫对蜜蜂球囊菌的抵抗力。 β -GBP 是中华蜜蜂的重要免疫识别蛋白, 在抵御真菌入侵过程中发挥重要作用。

关键词: 中华蜜蜂; β -1,3-葡聚糖结合蛋白; 蜜蜂球囊菌; 免疫响应; RNA 干扰

资助项目: 国家自然科学基金(32372943); 国家现代农业蜂产业技术体系专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金(2025J01616, 2023J01447); 福建农林大学科技创新专项基金(KFb22060XA)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372943), the China National Bee Industry Technology System (CARS-44-KXJ7), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2025J01616, 2023J01447), and the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Innovation Special Fund (KFb22060XA).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Dafu, dfchen826@fafu.edu.cn; FU Zhongmin, fzm@fafu.edu.cn

Received: 2025-11-07; Accepted: 2026-01-11; Published online: 2026-04-20

Role of the β -1,3-glucan-binding protein gene in *Apis cerana cerana* against *Ascosphaera apis* infection

WANG Fangji^{1#}, CHEN Xinrui^{1#}, GAO Yaqin¹, ZHANG Yuwei¹, GAN Genchao¹, ZHOU Shuai¹, GUO Rui^{1,2,3}, QIU Jianfeng^{1,2,3}, FU Zhongmin^{1,2,3*}, CHEN Dafu^{1,2,3*}

1 College of Bee Science and Biomedicine, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

2 National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotxin, Fuzhou, Fujian, China

3 Apitherapy Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

Abstract: [Objective] To analyze the expression profile of the β -glucan-binding protein (Ac β -GBP) gene of *Apis cerana cerana* in response to *Ascosphaera apis* infection and to investigate the impacts of Ac β -GBP knockdown on the larval mortality and the incidence of chalkbrood disease following *A. apis* infection. These findings will provide a foundation for further functional research. [Methods] The sequence and structural characteristics of Ac β -GBP were analyzed *via* bioinformatics approaches. RT-qPCR was employed to investigate the expression profiles of Ac β -GBP in the larval midgut following *A. apis* infection. Furthermore, RNA interference (RNAi) was utilized to explore the impacts of Ac β -GBP on the larval mortality and the incidence of chalkbrood disease. [Results] The CDS length of Ac β -GBP was 1 440 bp, encoding a protein with a molecular weight of 54.68 kDa and a grand average of hydropathicity value of -0.22, which contained a typical transmembrane domain and signal peptide. Phylogenetic analysis revealed that β -GBP of *A. c. cerana*, *Apis florea* and *Apis dorsata* clustered into a single major clade. After *A. apis* infection, the expression level of Ac β -GBP in the midgut of *A. c. cerana* worker larvae was downregulated at 1–3 days post-infection (dpi) ($P < 0.05$). Following RNA interference (RNAi)-mediated silencing of Ac β -GBP, its expression level was lower than that in the ds-egfp group at 2 and 3 dpi ($P < 0.01$). The cumulative larval mortality and the incidence of chalkbrood disease both increased over the infection time, and the overall mortality was higher than that of the control group ($P < 0.000 1$). [Conclusion] Ac β -GBP was capable of responding to *A. apis* infection, and knockdown of Ac β -GBP expression significantly impaired the resistance of honeybee larvae to *A. apis*. Collectively, β -GBP acts as an important immune recognition protein in *A. c. cerana*, and plays an important role in defending against fungal invasion.

Keywords: *Apis cerana cerana*; β -1,3-glucan-binding protein; *Ascosphaera apis*; immune response; RNA interference

β -1,3-葡聚糖结合蛋白(beta-1,3-glucan-binding protein, β -GBP)属于GNBP/ β -葡聚糖识别蛋白家族,是识别蛋白中的重要一员。 β -GBP是真菌表面 β -1,3-葡聚糖的重要识别受体,在昆虫天然免疫中起着重要的作用^[1]。黑腹果蝇

(*Drosophila melanogaster*)体内革兰氏阴性结合蛋白(β GRP/GNBP3)识别 β -1,3-葡聚糖,激活下游蛋白酶级联反应,最终激活Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)信号通路,合成抗菌肽,抵御真菌感染^[2]。类似地,在家蚕(*Bombyx mori*)^[3]、印

度明对虾(*Fenneropenaeus indicus*)^[4]和东北大黑鳃金龟(*Holotrichia diomphalia*)^[5]中也发现 β -GBP 能结合 β -1,3-葡聚糖, 通过触发酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 级联反应来抵抗细菌和真菌感染。 β -GBP 激活的酚氧化酶级联反应是无脊椎动物抗真菌或细菌的关键先天免疫机制。在蜜蜂方面, 对西方蜜蜂(*Apis mellifera*)幼虫注射幼虫芽孢杆菌(*Paenibacillus larvae*)会诱导 β -GBP、PO 和丝氨酸蛋白酶等免疫基因表达, 以抵抗美洲幼虫腐臭病^[6]。

蜜蜂对全球农业生产与经济发展具有不可替代的重要作用, 它们不仅是蜂蜜等蜂产品的核心生产者, 更承担着农业及园艺作物异花授粉的关键功能。蜜蜂的健康状况直接关系到生态平衡与粮食安全, 因此保障蜜蜂群体健康至关重要。然而, 蜜蜂的生存正面临多重威胁, 其中由蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)感染引发的白垩病是危害蜂群存活的重要病害之一^[7]。冯睿蓉^[8]发现, 蜜蜂等昆虫主要通过氧化反应对外源有害物质进行解毒, 蜜蜂球囊菌感染会诱导幼虫体内解毒相关基因上调, 增强氧化反应强度, 进而影响其氧化应激能力; 而在成年工蜂中该真菌感染可激活免疫缺陷 (immune deficiency, IMD) 和 Toll 等免疫相关通路, 促使抗菌肽等关键免疫效应分子高表达以抵御病原胁迫^[9]。尽管 β -GBP 作为昆虫先天免疫中的重要模式识别蛋白, 其抗真菌功能已在多种无脊椎动物中得到证实, 但在蜜蜂中 β -GBP 的免疫功能尚未被研究。

中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 的 β -GBP ($Ac\beta$ -GBP) 在抵御蜜蜂球囊菌感染中的具体作用尚不明确。基于此, 本研究克隆了中华蜜蜂 β -GBP ($Ac\beta$ -GBP) 基因的编码序列 (coding sequence, CDS), 预测了其编码蛋白的理化性质与分子特征, 分析其与其他物种 β -GBP 的结构域差异及亲缘关系; 进一步解析了 $Ac\beta$ -GBP 在蜜蜂球囊菌感染后的表达模式, 并通过 RNA 干扰技术探究了该基因对幼虫白垩病发病率及死亡率的影响, 以期深入阐明中华蜜蜂抗白垩病的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蜜蜂球囊菌由福建农林大学蜂学与生物医学学院蜜蜂保护实验室保存, 该菌在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 的保藏号为 No. 40895。中华蜜蜂工蜂幼虫取自福建农林大学蜂学与生物医学学院饲养的蜂群。

1.2 蜜蜂球囊菌接种及蜜蜂幼虫肠道样品制备

参照 Chen 等^[10]已建立的技术流程, 选取 2 日龄中蜂幼虫置于 48 孔板 (每孔含 50 μ L 的人工饲料), 饲料配比: 蜂王浆 63% (王浆酸含量 ≥ 1.4), 无菌水 30%, 蜂蜜 6% (土蜂蜜, 执行标准: GB 14963), 酵母提取物 (上海吉至生化科技有限公司) 1%, 在 (35 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、相对湿度 90% 条件下饲养; 对照组 3 日龄幼虫饲喂不含蜜蜂球囊菌孢子的饲料, 处理组饲喂终浓度 1×10^6 个/mL 蜜蜂球囊菌孢子的饲料 (0 days post inoculation, 0 dpi), 每 24 h 更换饲料并饲养至 6 日龄。剖取 4–6 日龄 (1–3 dpi) 两组幼虫肠道组织, 经液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 以 3 头幼虫肠道为 1 个生物学重复, 共设 3 个生物学重复。

本研究选用的 1×10^6 个/mL 蜜蜂球囊菌孢子接种浓度, 参考 Chen 等^[10]已建立的标准化侵袭体系, 并经预实验验证: 该浓度可使中华蜜蜂工蜂幼虫呈现稳定且可重复的白垩病发病特征, 发病强度与自然蜂群一致, 同时避免因浓度过高导致幼虫快速死亡或浓度过低导致发病不规律, 确保基因干扰效应能够被有效检测。

1.3 PCR 扩增和 Sanger 测序

根据 NCBI GenBank 数据库收录的 $Ac\beta$ -GBP (GenBank 登录号为 XM_017049917.3) 的核苷酸序列, 对 CDS 进行分段克隆, 设计并合成 3 对特异性扩增引物 [原始数据存储于 ScienceDB

(www.scidb.cn)微生物学报社区, DOI 为 10.57760/sciencedb.j00231.00046]。利用 SteadyPure 快速 RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)提取幼虫肠道样品的总 RNA, 并反转录获得 cDNA。PCR 反应体系(20 μ L): PCR Mix 10 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物(2.5 pmol/ μ L)各 1 μ L, DEPC 水 7 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min。

1.4 生物信息学及系统进化分析

Ac β -GBP 的核苷酸序列通过 ORF 工具获得氨基酸序列。利用 ProParam、TMHMM、ProtScale、NetPhos 3.1 Server 和 SignalP 6.0 Server 在线网站预测 *Ac β -GBP* 蛋白的理化性质、跨膜结构域、亲水性、磷酸化位点和信号肽。二级结构、三级结构和亚细胞定位的预测利用 SOPMA^[11]、SWISS-MODEL^[12]和 PSORT II^[13]网站进行。

同源性分析所用序列均下载自 NCBI GenBank 数据库, 包括 *A. c. cerana* XP_016905406.1、小蜜蜂(*Apis florea*) XP_003690362.2、大蜜蜂(*Apis dorsata*) XP_006607921.1、熊蜂(*Bombus affinis*) XP_050587351.1、欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*) XP_012167632.1、果壁蜂(*Osmia lignaria*) XP_034187872.1、毕氏卵角蚁(*Ooceraea biroii*) XP_011342604.2、狐条蜂(*Anthophora quadrimaculata*) CAK9811243.1、黑大蜜蜂(*Apis laboriosa*) XP_043789953.1、黄脚胡蜂(*Eufriesea mexicana*) XP_017759246.1 的 β -GBP 氨基酸序列。利用 MEGA 11.0^[14]软件中的 ClustalW 工具对上述 10 个物种的 β -GBP 进行多重比对, 再通过 bootstrap 邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树, 设置 1 000 次重复。采用 Blast 的 CD-search 工具和 MEME^[15]网站分别鉴定上述各物种 β -GBP 的保守基序和结构域。通过 TBtools 软件^[16]将鉴定到

的保守基序和结构域进行可视化。以上软件均采用默认参数。

1.5 实时荧光定量逆转录 PCR

根据 *Ac β -GBP* 的核苷酸序列, 利用 Primer Premier 6 软件^[17]设计 *Ac β -GBP* 的实时荧光定量逆转录 PCR (real-time RT-PCR, RT-qPCR) 引物(DOI 为 10.57760/sciencedb.j00231.00046)。以 *AcActin* (GenBank 登录号为 XM_017059068.2) 作为内参基因。反应在 ABI Quant Studio 3 荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems 公司)中进行。RT-qPCR 反应体系和程序参照郭意龙等^[18]的方法。RT-qPCR 进行 3 次技术重复和 3 次生物学重复。

1.6 RNA 干扰

根据 *Ac β -GBP* CDS 的核苷酸序列, 设计特异性干扰靶点和引物(DOI 为 10.57760/sciencedb.j00231.00046)。引物 PCR 扩增并连接 pClone007 质粒, 将测序正确的菌液转入新鲜 LB 菌液中扩大培养, 利用去内毒素质粒提取试剂盒提取重组质粒。按照 T7 RNAi Transcription Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)试剂盒说明书, 在干扰片段特异性引物的 5'端增加 T7 启动子序列(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), 以重组质粒为模板进行 PCR 扩增。通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物后回收目的片段。利用 T7 RNAi Transcription Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的步骤进行 dsRNA 的体外转录合成(ds-*Ac β -GBP*)。以绿色荧光蛋白基因 *egfp* 的干扰片段作为阴性对照(ds-*egfp*)。dsRNA 的浓度和纯度由超微量测定仪检测。

参照郭意龙等^[19]的方法进行 dsRNA 的饲喂。蜜蜂球囊菌侵染的 3 日龄(0 dpi)幼虫, 吸取 1 000 ng 的 ds-*Ac β -GBP* 滴加至 50 μ L 饲料中混匀作为实验组, 命名为 *A. apis*+ds-*Ac β -GBP*。同样地, 饲喂 1 000 ng 的 ds-*egfp* 幼虫作为对照组, 命名为 *A. apis*+ds-*egfp*。每隔 24 h 饲喂含

有相同量的 dsRNA 的人工饲料, 直至 3 dpi。解剖 *A. apis*+ds-*Acβ-GBP* 和 *A. apis*+ds-*egfp* 组的 1-3 dpi 肠道样本。3 头幼虫的肠道样品作为 1 个生物学重复, 共设 3 个生物学重复。

1.7 累计死亡率和白垩病发病率统计

幼虫在蜜蜂球囊菌接种和 dsRNA 干扰后, 持续饲喂至 7 dpi, 更换饲料前统计各组幼虫死亡数量和发病数量, 最终计算 1-7 dpi 的幼虫累计死亡率和白垩病发病率, 如公式(1)、(2)所示。

$$\text{死亡率} = (\text{每组每个生物学重复死亡幼虫数量} / \text{每组每个生物学重复总幼虫数量}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发病率} = (\text{每组每个生物学重复发病幼虫数量} / \text{每组每个生物学重复总幼虫数量}) \times 100\% \quad (2)$$

本研究对照组和处理组各设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复 16 头幼虫。

1.8 数据统计

基因的相对表达量利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[20] 进行计算。RT-qPCR 的数据分析及图片绘制采用 GraphPad Prism (v9.1.0) 软件进行, 其中数据以平均值±标准差(mean±SD)表示, 分析方法为 *t* 检验 (ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$)。幼虫累计死亡率和白垩病发病率的数据结果采用 GraphPad Prism 8 软件绘制图片, 利用 mean±SD 表达数据, 利用

双因素方差分析(two-way ANOVA)分析数据显著性。

2 结果与分析

2.1 *Acβ-GBP* CDS 的分子克隆

凝胶电泳结果显示, 分段扩增出 3 条 *Acβ-GBP* 的 CDS 片段, 克隆的 *Acβ-GBP-1*、*Acβ-GBP-2*、*Acβ-GBP-3* 的长度分别为 564、520、567 bp (图 1)。Sanger 测序的比对结果显示, 3 条片段序列与 NCBI 预测的 *Acβ-GBP* 序列相同(DOI 为 10.57760/sciencedb.j00231.00046)。结果表明, *Acβ-GBP* 基因在中蜂工蜂幼虫肠道中表达, 且其 CDS 区被成功克隆。

2.2 *Acβ-GBP* 蛋白的理化性质和分子特征

Acβ-GBP 的 CDS 包含 1 440 个核苷酸, 可编码 479 个氨基酸。*Acβ-GBP* 分子量约为 54.68 kDa, 分子式为 $C_{2487}H_{3831}N_{647}O_{713}S_{15}$, 脂溶系数为 97.22, 等电点为 6.54。*Acβ-GBP* 含有 20 种氨基酸, 其中含量最高的是异亮氨酸(53 个), 含量最低的是蛋氨酸(7 个)。在 *Acβ-GBP* 中丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点数量分别为 18、10、12 个(图 2A)。*Acβ-GBP* 的平均亲水系数为 -0.22, 疏水氨基酸数量少于亲水氨基酸

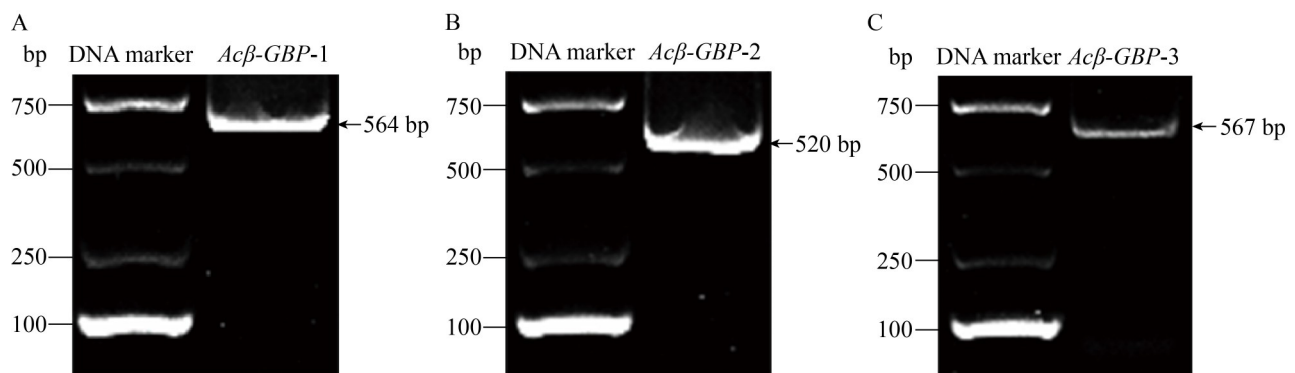


图1 *Acβ-GBP* CDS的分子克隆

Figure 1 Molecular cloning of *Acβ-GBP* CDS. A, B, C: Agarose gel electrophoresis for the PCR amplification products from three fragments of *Acβ-GBP* CDS.

(图 2B)。Ac β -GBP 蛋白具有典型的跨膜结构域和信号肽(图 2C、2D)。Ac β -GBP 中包含 22 个 (4.59%) α -螺旋, 135 条 (28.18%) 延长链, 322 个 (67.22%) 无规则卷曲(图 2E)。三级结构分析结果显示 Ac β -GBP 与其模板 A0A7M6UV61.1.A 之间的同源性为 91.18% (图 2F)。亚细胞定位预测结果显示, Ac β -GBP 可同时定位于内质网、细胞质、高尔基体、分泌系统囊泡、细胞外(包括细胞壁)和线粒体, 占比分别为 22.20%、22.20%、22.20%、11.10%、11.10% 和 11.10%。

2.3 Ac β -GBP 蛋白的保守基序、结构域和系统进化分析

如图 3A 所示, Ac β -GBP 蛋白存在 5 个保守基序。在大蜜蜂、黑大蜜蜂、小蜜蜂、黄脚胡蜂、熊蜂、欧洲熊蜂、狐条蜂、果壁蜂和

毕氏卵角蚁的 β -GBP 同样存在上述 5 个保守基序(图 3A)。Ac β -GBP 中含有 GH16_beta_GRP 和 CBM39 结构域; 在小蜜蜂、欧洲熊蜂、黑大蜜蜂、熊蜂和大蜜蜂的 β -GBP 中也存在上述 2 个结构域。狐条蜂、黄脚胡蜂、果壁蜂和毕氏卵角蚁的 β -GBP 含有 LamG superfamily 和 CBM39 结构域。

系统进化分析表明中华蜜蜂的 β -GBP 单独聚为一小支, 与大蜜蜂、黑大蜜蜂、和小蜜蜂的 β -GBP 共同聚为一大支; 根据氨基酸序列比对, 中华蜜蜂与小蜜蜂的 β -GBP 氨基酸序列相似性为 88.09%, 中华蜜蜂与大蜜蜂为 90.02%, 中华蜜蜂与黑大蜜蜂为 89.17%。熊蜂和欧洲熊蜂聚为一支。黄脚胡蜂、果壁蜂和狐条蜂的 β -GBP 聚为一支(图 4)。

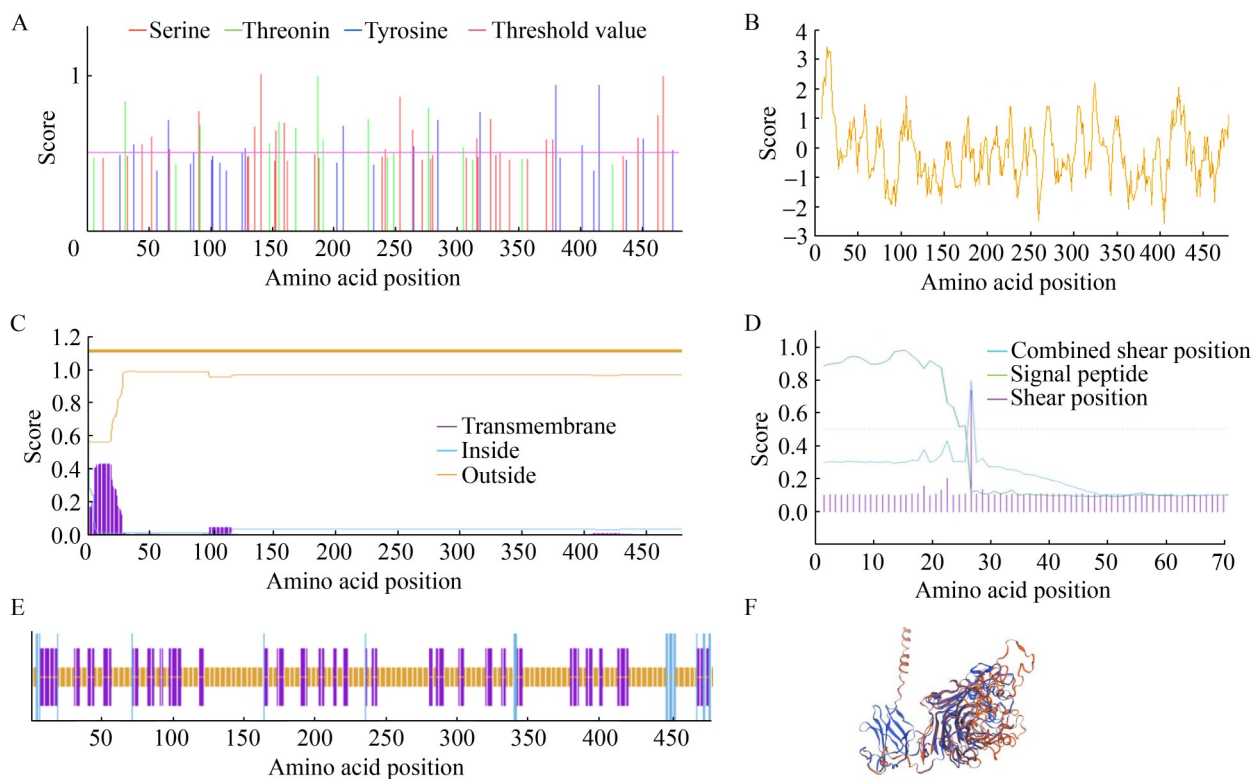


图2 Ac β -GBP蛋白的理化性质和分子特征

Figure 2 Physicochemical property and molecular characteristics of Ac β -GBP protein. A: Phosphorylation site; B: Hydrophilic property; C: Transmembrane domain; D: Signal peptide; E: Secondary structure; F: Tertiary structure.

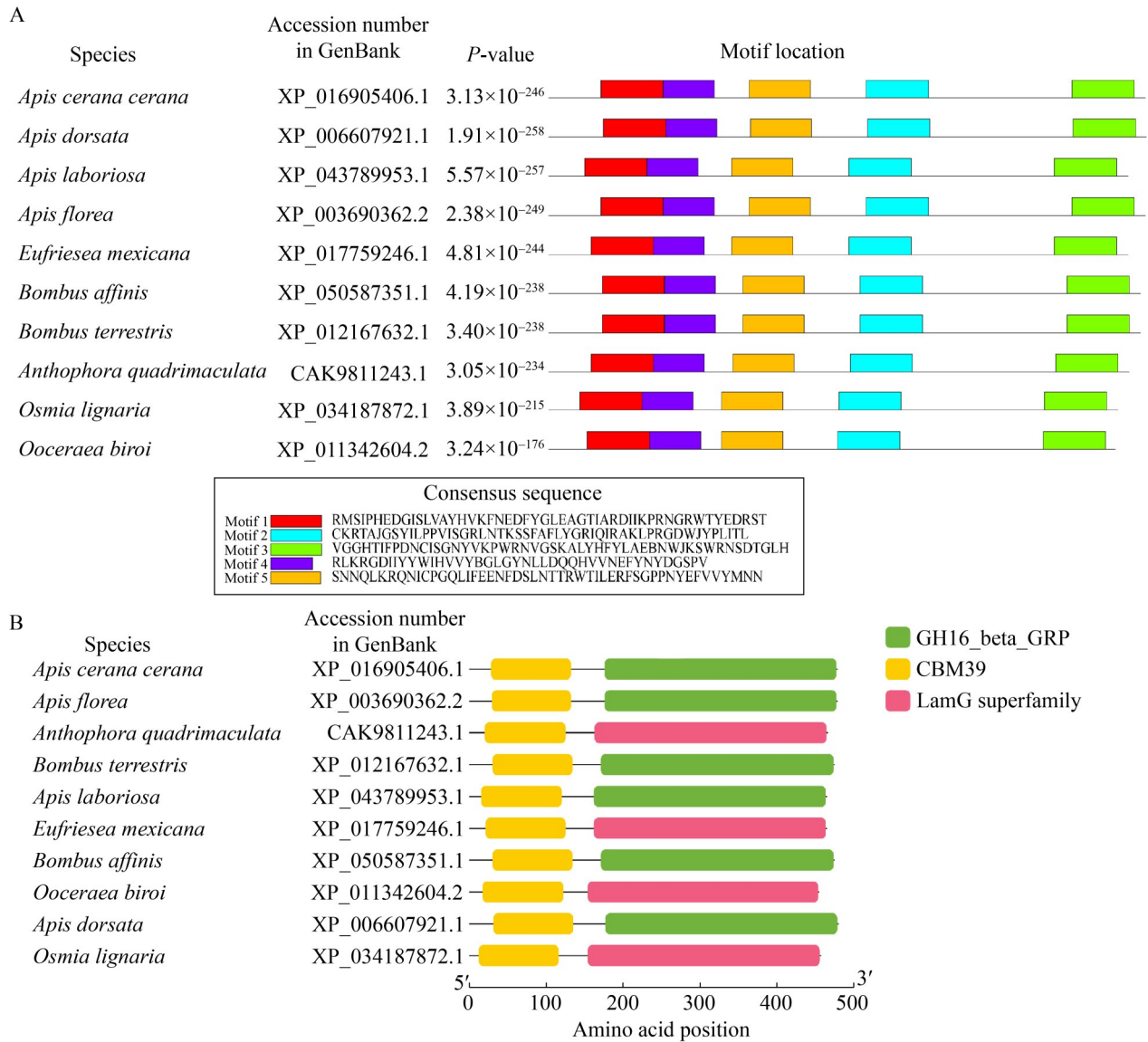


图3 中华蜜蜂和其他9个物种β-GBP蛋白含有的保守基序(A)和结构域(B)

Figure 3 Motifs (A) and domains (B) of β-GBP proteins in *Apis cerana cerana* and other nine species.

2.4 干扰 *Acβ-GBP* 影响中蜂工蜂幼虫的死亡率和白垩病发病率

RT-qPCR 结果显示，蜜蜂球囊菌侵染后 *Acβ-GBP* 的表达量显著下调 ($P < 0.05$) (图 5)。

进一步调查了干扰 *Acβ-GBP* 后，幼虫对蜜蜂球囊菌侵染的抵抗力。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明成功合成 *Acβ-GBP* 的干扰序列 ds-*Acβ-GBP* (248 bp) 和阴性对照序列 ds-egfp

(255 bp) (图 6A)。蜜蜂球囊菌侵染后饲喂 ds-*Acβ-GBP* 和 ds-egfp，干扰 *Acβ-GBP* 的肠道中 *Acβ-GBP* 的表达量在 1 dpi 显著低于 ds-egfp 组 ($P < 0.05$)，在 2 dpi 和 3 dpi 极显著低于 ds-egfp 组 ($P < 0.01$) (图 6B)。蜜蜂球囊菌侵染后，干扰 *Acβ-GBP* 的幼虫累计死亡率均随侵染时间而增加，并且整体死亡率极显著高于对照组 ($P < 0.0001$) (图 6C)。进一步统计蜜蜂球囊菌接种后，干扰

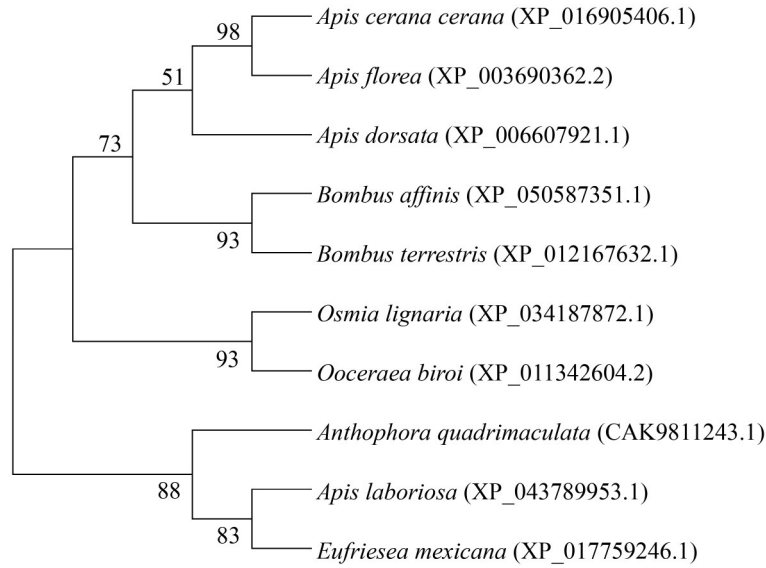


图4 邻接法构建基于 β -GBP蛋白的中华蜜蜂与其他物种的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of *Apis cerana cerana* and other species based on β -GBP proteins by neighbor-joining method. The numbers in parentheses in the figure are the accession numbers of the species in GenBank; The numbers on the branches are the bootstrap values.

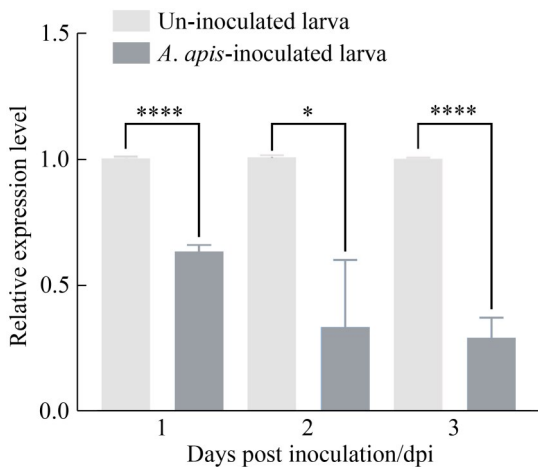


图5 蜜蜂球囊菌接种后中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中 $Ac\beta$ -GBP的相对表达量

Figure 5 Relative expression levels of $Ac\beta$ -GBP in the guts of *Apis cerana cerana* worker larvae inoculated with *Ascospaera apis*. *: $P < 0.05$; ****: $P < 0.0001$.

$Ac\beta$ -GBP 死亡幼虫的白垩病发病率。结果显示干扰 $Ac\beta$ -GBP 和对照组的幼虫白垩病发病率均随感染时间而增加。干扰 $Ac\beta$ -GBP 的白垩病发病率极显著高于对照组 ($P < 0.0001$) (图 6D)。

3 讨论与结论

昆虫几乎存在于所有栖息地和生态系统中，其快速的繁殖速度、强大的适应能力以及面对病原体威胁时高效的免疫应答起到了至关重要的作用^[21]。昆虫的 β -GBP 的功能是作为模式识别蛋白，能够识别病原体细胞壁表面的 β -1,3-葡聚糖，并与其结合，进而激活宿主的 Toll 信号通路和 PO 级联反应^[4]，这是无脊椎动物抵御病原体入侵的重要免疫防御屏障^[22]。 β -GBP 的免疫功能在无脊椎动物中已被广泛研究，研究对象包括家蚕、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 等^[23-26]。然而，中华蜜蜂的 β -GBP 在抵抗病原体侵染时的作用尚不清楚。本研究克隆了中华蜜蜂 β -GBP 的 CDS 区，解析了蜜蜂球囊菌侵染后 β -GBP 的表达模式和作用，为后续的功能研究奠定了基础。

$Ac\beta$ -GBP 蛋白具有亲水性、跨膜结构域及

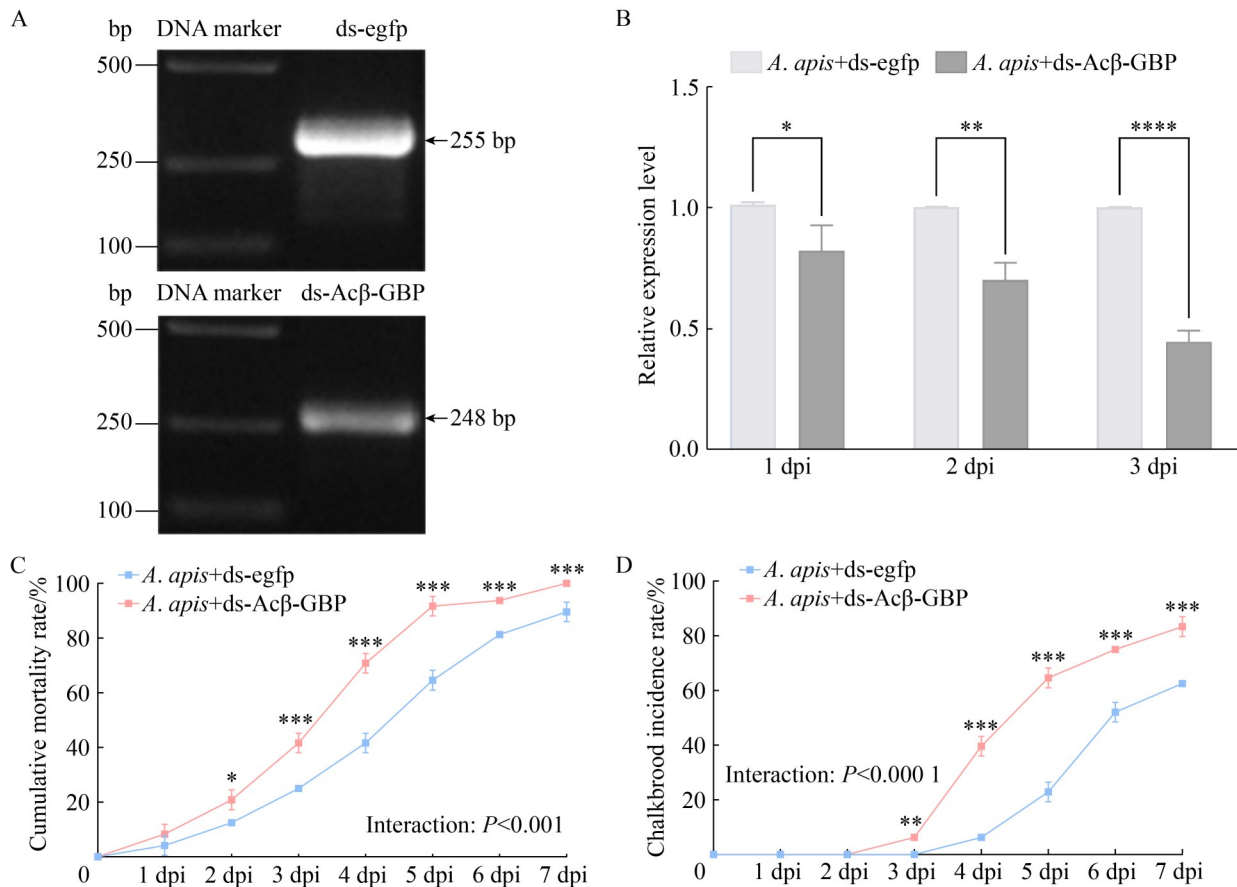


图6 干扰Acβ-GBP对工蜂幼虫抵抗蜜蜂球囊菌侵染的影响

Figure 6 The effect of interfering with *Acβ-GBP* on the resistance of worker larvae to *Ascospaera apis* infection. A: Detection of dsRNA from *in vitro* transcription by agarose gel electrophoresis; B: Determination of relative expression level of *Acβ-GBP* in the midguts of *Apis cerana cerana* worker larvae inoculated with *Ascospaera apis* after feeding dsRNA; C, D: Cumulative mortality rate and Chalkbrood incidence rate of *Apis cerana cerana* worker larvae inoculated with *Ascospaera apis* after silencing *Acβ-GBP*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

信号肽,符合模式识别受体横跨细胞膜、识别病原体的结构特征^[27]。Acβ-GBP与其他9个物种的β-GBP均含有5个保守基序和CBM39结构域(图3),其中CBM39结构域被证实参与病原体识别^[28];而Acβ-GBP特有的GH16_beta-GRP结构域,推测可通过结合并降解β-1,3-葡聚糖,激活PO系统^[1]。中华蜜蜂与小蜜蜂和大蜜蜂的β-GBP聚为一支,氨基酸序列相似性高达88.00%以上,表明该基因在蜜蜂类群中具有高度保守性,暗示其功能的进化稳定性(图4)。

蜜蜂球囊菌的孢子侵入幼虫肠道后在厌氧条件下受CO₂诱导而活化萌发,至预蛹期中肠和后肠隔膜解除,孢子随食物残渣涌入后肠,接触氧气后孢子剧烈萌发;菌丝大量生长,肉眼可见白色、黑色或灰色的白垩虫尸^[29]。为解析Acβ-GBP对幼虫抵抗蜜蜂球囊菌侵染的作用,本研究初步解析了蜜蜂球囊菌侵染后β-GBP的表达模式和作用。小菜蛾在响应金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)侵染时其体内的β-GBP基因mRNA水平显著上调,进一步增强

β -GBP 对血淋巴酚氧化酶原(pro-phenoloxidase, PPO)的激活,从而杀灭入侵微生物^[23]。不同的是,本研究发现蜜蜂球囊菌感染后幼虫肠道中 Ac β -GBP 基因的表达量在 1–3 dpi 均显著下调 ($P < 0.05$) (图 5)。该结果与其他物种 β -GBP 的表达模式存在差异,可能是 Ac β -GBP 对蜜蜂球囊菌的响应存在滞后性。在蜜蜂球囊菌感染后利用饲喂法成功干扰中蜂幼虫 Ac β -GBP 的表达 (图 6A、6B)。干扰 Ac β -GBP 后,幼虫的死亡率和白垩病发病率均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 6C、6D),可能是由于干扰 Ac β -GBP 的表达,导致幼虫对蜜蜂球囊菌细胞壁表面的 β -1,3-葡聚糖的识别减弱,酚氧化酶级联反应未被充分激活。这一现象与其他研究结论一致。在家蚕和多种对虾中通过抗体阻断或 RNAi 技术干扰 β -GBP 的功能会显著抑制酚氧化酶系统的激活,并降低宿主对真菌病原体的抵抗能力^[30–31]。同样地,在赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)等昆虫模型中的研究也证实, β -GBP 是启动抗真菌免疫的关键模式识别受体,其功能缺失会导致严重的免疫缺陷^[32]。这些来自不同物种的证据共同表明, β -GBP 在无脊椎动物的先天免疫防御中扮演着一个古老而保守的核心角色。本研究表明干扰 Ac β -GBP 会导致中蜂工蜂幼虫在响应蜜蜂球囊菌感染时的生存能力降低,并提高白垩病发病率。

作者贡献声明

王芳吉: 样品制备、生物信息学分析、RNA 干扰、表达量测定等实验操作过程、数据分析、执行背景调研、撰写文章; 陈心蕊: 数据分析、方法论、验证、撰写文章; 高雅琴: 数据收集与监管, 执行调研; 张雨薇: 协助 RNA 干扰实验, 及工蜂幼虫的死亡率和白垩病发病率统计; 干根超: 协助完成各实验操作过程; 周帅: 协助完成各实验操作过程; 郭睿: 提出概念, 获取基金, 提供主要试剂与仪器, 审阅; 邱剑丰: 数据收集与监管, 数据分析, 项目管理, 统筹全文思路及审阅; 付中民: 提出概念, 获取基金, 提供主要试剂与仪器, 审阅; 陈大福: 提出概念, 获

取基金, 提供主要试剂与仪器, 审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Ochiai M, Ashida M. A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. the binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(7): 4995-5002.
- [2] Wang GB, Xu DD, Guo DG, Zhang YZ, Mai XX, Zhang BR, Cao H, Zhang SX. Unraveling the innate immune responses of *Bombyx mori* hemolymph, fat body, and midgut to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus oral infection by metabolomic analysis[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2021, 108(4): e21848.
- [3] Mishima Y, Quintin J, Amanianda V, Kellenberger C, Coste F, Clavaud C, Hetru C, Hoffmann JA, Latgé JP, Ferrandon D, Roussel A. The N-terminal domain of *Drosophila* Gram-negative binding protein 3 (GNBP3) defines a novel family of fungal pattern recognition receptors[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(42): 28687-28697.
- [4] Anjugam M, Vaseeharan B, Iswarya A, Amala M, Govindarajan M, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Benelli G. A study on β -glucan binding protein (β -GBP) and its involvement in phenoloxidase cascade in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Molecular Immunology, 2017, 92: 1-11.
- [5] Lee MH, Osaki T, Lee JY, Baek MJ, Zhang R, Park JW, Kawabata SI, Söderhäll K, Lee BL. Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3-beta-D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(5): 3218-3227.
- [6] Al-Ghamdi AA, Al-Ghamdi MS, Ahmed AM, Mohamed ASA, Shaker GH, Ansari MJ, Dorrah MA, Ali Khan K, Ayaad TH. Immune investigation of the honeybee *Apis mellifera jemenitica* broods: a step toward production of a bee-derived antibiotic against the American foulbrood[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(3): 1528-1538.
- [7] Zhang KY, Fu ZM, Fan XX, Wang ZX, Wang SY, Guo SJ, Gao XZ, Zhao HD, Jing X, Zou PY, Li QM, Chen MJ, Chen DF, Guo R. Effect of *Ascosphaera apis* infestation on the activities of four antioxidant enzymes in Asian honey bee larval guts[J]. Antioxidants, 2023, 12(1): 206.
- [8] 冯睿蓉. 微小RNA介导中华蜜蜂工蜂幼虫响应蜜蜂球囊菌感染的分子机制[D]. 福州: 福建农林大学, 2021. Feng RR. The molecular mechanism underlying microRNA-mediated response of *Apis cerana cerana* workers' larvae to *Ascosphaera apis* infection[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2021 (in Chinese).

- [9] 侯梦赏, 梁铖, 展江, 秦加敏, 邓尚靠, 宗德琴, 李志国. 球囊菌感染对意大利蜜蜂成年工蜂的影响[J]. 河南农业科学, 2023, 52(10): 131-140.
Hou MS, Liang C, Zhan J, Qin JM, Deng SK, Zong DQ, Li ZG. Effect of *Ascospaera apis* infection on worker bees of *Apis mellifera ligustica*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(10): 131-140 (in Chinese).
- [10] Chen DF, Guo R, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Fu ZM. Morphological and molecular identification of chalkbrood disease pathogen *Ascospaera apis* in *Apis cerana cerana*[J]. Journal of Apicultural Research, 2018, 57(4): 516-521.
- [11] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1995, 11(6): 681-684.
- [12] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [13] Sedaghat-Nejad E, Fakharian MA, Pi J, Hage P, Kojima Y, Soetedjo R, Ohmae S, Medina JF, Shadmehr R. P-sort: an open-source software for cerebellar neurophysiology[J]. Journal of Neurophysiology, 2021, 126(4): 1055-1075.
- [14] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [15] Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): W369-W373.
- [16] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [17] Singh VK, Mangalam AK, Dwivedi S, Naik S. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence[J]. BioTechniques, 1998, 24(2): 318-319.
- [18] 郭意龙, 余尚骏, 赵萧, 钱加珺, 赵浩东, 张婕, 张扬, 赵红霞, 徐细建, 骆群, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(12): 5005-5017.
Guo YL, Yu KJ, Zhao X, Qian JJ, Zhao HD, Zhang J, Zhang Y, Zhao HX, Xu XJ, Luo Q, Chen DF, Guo R. Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(12): 5005-5017 (in Chinese).
- [19] 郭意龙, 赵萧, 张天泽, 宋宇轩, 赵浩东, 范小雪, 任中民, 张婕, 赵红霞, 徐细建, 陈大福, 郭睿. 西方蜜蜂几丁质合成酶基因的生物信息学分析及功能研究[J]. 昆虫学报, 2023, 66(4): 469-477.
Guo YL, Zhao X, Zhang TZ, Song YX, Zhao HD, Fan XX, Ren ZM, Zhang J, Zhao HX, Xu XJ, Chen DF, Guo R. Bioinformatic analysis and functional study on chitin synthase gene in *Apis mellifera*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(4): 469-477 (in Chinese).
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: the same, with differences[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1625-1639.
- [22] Wu TY, Zhao Y, Wang ZY, Song QS, Wang ZX, Xu QW, Wang YJ, Wang LB, Zhang YQ, Feng CJ. β -1,3-glucan recognition protein 3 activates the prophenoloxidase system in response to bacterial infection in *Ostrinia furnacalis* Guenée[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 79: 31-43.
- [23] 李双双. 小菜蛾 IDGF 和 β GBP 对蝉拟青霉侵染的免疫应答研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
Li SS. Effect of IDGF and β GBP on humoral immunity of *Plutella xylostella* against *Paecilomyces cicadae*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [24] Tran NT, Kong TT, Zhang M, Li SK. Pattern recognition receptors and their roles on the innate immune system of mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 102: 103469.
- [25] Gu YL, Zhu L, Wang XR, Li H, Hou LB, Kong XH. Research progress of pattern recognition receptors in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 141: 109028.
- [26] Shi CC, Lin TH, Qu C. The role of pattern recognition receptors in the innate immune system of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 154: 109946.
- [27] Anjugam M, Iswarya A, Vaseeharan B. Multifunctional role of β -1,3 glucan binding protein purified from the haemocytes of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and *in vitro* antibacterial activity of its reaction product[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 48: 196-205.
- [28] Shao ZL, Lan CP, Yu XP, Wang ZL. RNAi-mediated silencing of NIGRP3 augments the insecticidal virulence of *Metarhizium anisopliae* to the brown planthopper *Nilaparvata lugens*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2024, 205: 106141.
- [29] Evison SE. Chalkbrood: epidemiological perspectives from the host-parasite relationship[J]. Current Opinion in Insect Science, 2015, 10: 65-70.
- [30] Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, Lemaitre B. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(5): e1004067.
- [31] Sritunyalucksana K, Lee SY, Söderhäll K. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2002, 26(3): 237-245.
- [32] Zou Z, Evans JD, Lu ZQ, Zhao PC, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D, Jiang HB. Comparative genomic analysis of the *Tribolium immune* system[J]. Genome Biology, 2007, 8(8): R177.